DiaMetra

FT4

pour analyses de routine

Détermination immunoenzymatique directe de la FT4 dans le sérum ou le plasma humain.

IVD | **LOT** Voir l'étiquette externe | 2°C 8°C | Σ = 96 tests | **RÉF DKO038**

USAGE PRÉVU

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de la FT4 dans le sérum ou le plasma humain.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

La thyroxine (T4), principale hormone thyroïdienne, circule dans le sang pratiquement toujours liée à des protéines de transport. Le transporteur principal est la 'thyroxin binding globuline' (TBG). Toutefois, seulement la fraction libre (non liée) de la thyroxine est responsable de l'activité biologique. De plus, les concentrations de protéines de transport sont modifiées lors de nombreuses conditions cliniques, telles que la grossesse. Dans la fonction thyroïdienne normale, lorsque les concentrations de la protéine de transport sont modifiées, le niveau total de thyroxine change afin de garder la concentration de thyroxine libre (FT4) constante. Donc, la mesure de la concentration de la thyroxine libre correspond mieux à l'état clinique que la concentration totale de thyroxine. L'augmentation de la thyroxine totale associée à une grossesse, la prise de contraceptifs oraux et une thérapie aux estrogènes peut résulter dans des concentrations de T4 totale plus grande que les limites normales, alors que la concentration de thyroxine libre demeure dans les limites normales.

Une fonction thyroïdienne anormale peut également être dissimulée dans des cas d'hyper et d'hypothyroïdie par des modifications de la concentration de TBG. La concentration de T4 totale peut être augmentée ou diminuée par des changements de TBG de tel sorte que des niveaux normaux sont obtenus.

La concentration de thyroxine libre peut ainsi contribuer à la détermination du statut clinique réel d'un patient.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Les réactifs nécessaires à cet essai immunoenzymatique sont des microplateaux sensibilisés avec des anticorps anti-T4, un conjugué enzyme-antigène et l'antigène T4 natif.

Lorsque le conjugué enzyme-antigène et le sérum contenant l'antigène T4 libre natif sont mis en contact dans le puits, une réaction de compétition se produit entre l'antigène T4 libre et le conjugué enzyme-antigène pour se fixer aux sites de liaison.

L'interaction est illustrée par l'équation suivante:

$$^{Enz}.\,Ag + Ag + Ab_{cw} \underset{K_{-a}}{\overset{K_a}{\rightleftarrows}} AgAb_{cw} + {}^{Enz}.\,Ag\,Ab_{cw}$$

Ab_{cw}: Anticorps monospécifique immobilisé (quantité constante)
Ag: Antigène natif (quantité variable)
^{Enz}.Ag.:Conjugué enzyme-antigène (quantité constante)
Ag Ab_{cw}: Complexe antigène-anticorps
^{Enz} Ag Ab_{cw}: Complexe enzyme-antigène anticorps-conjugué
K_a: Constante d'association
K_{-a}: constante de dissociation
$K= k_a / k_{-a}$: Constante d'équilibre

Une fois l'équilibre atteint, le conjugué lié à la phase solide est séparé de la fraction de conjugué libre par décantation ou aspiration. L'activité du conjugué lié à la phase solide est inversement proportionnelle à la concentration de l'antigène libre (FT4). En utilisant des étalons avec une concentration d'antigène connue, il est possible de construire une courbe sur laquelle interpoler un échantillon avec concentration non connue de FT4.

3. RÉACTIFS, MATÉRIAUX ET INSTRUMENTS

3.1. Réactifs et matériaux fournis dans le coffret

1. Étalons FT4 (6 flacons, 1 mL chaque)

STD_A	**RÉF DCE002/3806-0**
STD_B	**RÉF DCE002/3807-0**
STD_C	**RÉF DCE002/3808-0**
STD_D	**RÉF DCE002/3809-0**
STD_E	**RÉF DCE002/3810-0**
STD_F	**RÉF DCE002/3811-0**

2. Conjugué (1 flacon, 12 mL)
FT4 conjugué avec peroxydase de raifort (HRP)
RÉF DCE002/3802-0

3. Microplaque coatée (1 microplaque sécable)
Anti-FT4 adsorbée sur microplaque
RÉF DCE002/3803-0

4. Substrat TMB (1 flacon, 15 mL)
H_2O_2-TMB (0,26 g/L) *(éviter le contact avec la peau)*
RÉF DCE004-0

5. Solution d'arrêt (1 flacon, 15 mL)
Acide sulfurique 0,15 mol/L *(éviter le contact avec la peau)* **RÉF DCE005-0**

6. Solution de lavage conc. 50X (1 flacon, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **RÉF DCE006-0**

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le coffret

Eau distillée

3.3. Matériaux et instruments auxiliaires

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

Remarques

Conserver tous les réactifs à 2÷8 C° à l'abri de la lumière.

N'ouvrir le sachet de Réactif 3 (microplaque coatée) qu'après avoir amené celui-ci à température ambiante et refermez-le tout de suite après avoir prélevé les bandes à utiliser.

4. PRÉCAUTIONS D'USAGE

- Les réactifs ouverts, conservés à 2÷8°C sont stables pendant 60 jours.
- Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H_2O_2 à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes.
- Tous les produits contenant du sérum humain se sont démontrés non réactifs à l'antigène de surface de l'hépatite B et aux anti-corps anti-VIH 1 et 2 et VHC. Dans l'ignorance d'un test offrant la garantie absolue de l'absence de tout agent infectieux, tous les produits d'origine humaine devraient être gérés comme potentiellement dangereux et en mesure de transmettre des agents infectieux.
- La concentration de thyroxine total dans le sérum dépend de plusieurs facteurs : de la fonction de la thyroïde et de sa régulation, de la thyroxine liant la globuline (TBG) et de la liaison entre thyroxine et TBG. La concentration de la thyroxine totale est toutefois insuffisante à elle seule pour surveiller l'état clinique. Les valeurs de la thyroxine totale dans le sérum peuvent augmenter pendant la grossesse ou suite à l'administration de contraceptifs oraux. La table des médicaments interférants et les conditions dans lesquelles les valeurs de thyroxine totale sont influencés et ont été remplis par le Journal of the American Association of Clinical Chemists.
- Ne pas utiliser aux fins du dépistage chez les nouveaux-nés.

5. PROCÉDURE

5.1. Préparation des étalons (S_A…S_F)

Les étalons sont des étalons de référence sérique humaine de FT4 avec des concentrations approximatives de:

	S_A	S_B	S_C	S_D	S_E	S_F
ng/dL	0	0,3	0,95	2,.1	3,6	7,0

Conserver à 2÷8°C.
Les taux exacts sont rapportés dans les étiquettes pour chaque lot spécifique.

5.2. Préparation de la solution de lavage

Avant l'usage, diluer le contenu de chaque ampoule de solution de lavage concentrée et tamponnée (50x) avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 mL. Pour préparer des volumes moindres, respecter le rapport de dilution de 1:50. La solution de lavage diluée est stable à 2÷8°C pendant au moins 30 jours.

5.3. Préparation de l'échantillon

Recueillir l'échantillon au moyen d'une seringue de 10 mL dans des tubes de silicone. Observer les précautions habituelles dans le recueil des échantillons. Séparer les cellules de globules rouges par centrifugation et utiliser le sérum pour la détermination de la FT4. Les échantillons peuvent être réfrigérés à 2÷8°C (pendant une période maximale de 48 heures). Le conserver jusqu'à 30 jours à -20°C s'il ne peut pas être testé dans les 48 heures. Pour des tests en double, 0,10 mL d'échantillon sont nécessaires.

5.4. Procédure

Avant de procéder à la détermination, mettre tous les réactifs, sérums de référence et contrôles à température ambiante (22÷28°C).

Réactif	Étalon	Échantillon	Blanc
Étalon S_A-S_F	**50 µL**		
Échantillon		**50 µL**	
Conjugué	**100 µL**	**100 µL**	
Agiter délicatement la microplaque pendant 20-30 secondes et la couvrir. Laisser incuber 1h à température ambiante (22÷28°C). Éliminer le contenu de la microplaque par décantation ou aspiration. Pour l'élimination par décantation, assécher la microplaque avec du papier absorbant. Ajouter 300 µL de solution de lavage et lasser décanter ou aspirer. Répéter 2 fois pour un total de 3 lavages. Un laveur de plaque manuel ou automatique peut être utilisé. Suivre les instructions du producteur pour un usage approprié. Si une bouteille avec nébulisateur est utilisée, remplir chaque puits en évitant les bulles d'air. Laisser décanter la solution de lavage et répéter 2 fois encore.			
Substrat TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Laisser incuber à température ambiante (22÷28°C) pendant 15 minutes.			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Mélanger délicatement pendant 15-20 secondes. Lire l'absorbance de chaque puits à 450 nm par rapport au blanc (ou utilisant une longueur d'onde de référence à 620-630 nm pour minimiser les imperfections des puits) avec un lecteur de microplaque. Les résultats doivent être lits dans les trente (30) minutes après l'ajout de la solution d'arrêt.			

6. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Chaque laboratoire devrait tester les contrôles avec des taux d'hypothyroïde, d'euthyroïde et d'hyperthyroïde pour surveiller les performances du coffret. Ces contrôles doivent être traités comme inconnus et les valeurs déterminées dans chaque session.

Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées doivent, de plus, être utilisées pour vérifier la tendance. Chaque laboratoire devrait choisir les limites d'acceptabilité des performances du coffret. Les autres paramètres incluent les interceptions à 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage pour la reproductibilité inter-essai. De plus, l'absorbance maximale devrait refléter les valeurs des séances précédentes. Des déviations significatives par rapport aux prestations établies peuvent indiquer une altération inobservée des conditions expérimentales ou une dégradation des réactifs du coffret. Utiliser des réactifs frais pour déterminer les motifs des variations.

7. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

7.1. Prestations de l'analyse

Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons fortement lipémiques ou hémolysés. Il est important que le temps de réaction de chaque puits soit le même aux fins de la reproductibilité. Le temps de distribution des puits ne doit pas être supérieur à 10 minutes. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. L'ajout de substrat TMB entraîne une réaction cinétique qui se termine par l'ajout de la solution d'arrêt. L'ajout du substrat et de la solution d'arrêt doit advenir dans le même ordre afin d'éliminer des temps de réaction différents. Les lecteurs de plaques mesurent les DO verticalement. Ne pas toucher le fond des puits. Une aspiration incomplète de la solution de lavage dans les puits peut entraîner des réplicats de mauvaise qualité et de faux résultats.

7.2. Interprétation des résultats

Si un ordinateur a été utilisé pour calculer les résultats, il faut impérativement que les valeurs des calibrateurs tombent dans les 10 % des concentrations assignées.

8. RÉSULTATS

8.1. Remarques

Absorbance (S_A) = > 1,0A.

8.2. Courbe d'étalonnage

Tracer le graphique d'absorbance (Em) en fonction des concentrations des étalons (S_A –S_F).

Tracer la meilleur courbe passant par les points d'étalonnage (par ex. : tracé logistique à quatre paramètres).

8.3. Calcul des résultats

Sur le graphique, faire une interpolation des valeurs d'absorbance relatives à chaque échantillon et en lire la concentration correspondante en ng/dL.

9. VALEURS DE RÉFÉRENCE

Une étude de population adulte euthyroïde a été utilisée pour déterminer les valeurs prévues pour le coffret EIA FT4.

	Moyenne (ng/dL)	SD	Plage (ng/dL)
Adultes	1,4	0,6	0,8 – 2,0
Grossesse	1,5	0,7	0,8 – 2,2

10. PARAMÈTRES CARACTÉRISTIQUES

10.1. Précision

10.1.1. Intra-essai

La variabilité à l'intérieur du même coffret a été déterminée en répliquant (20x) la mesure de trois sérums de contrôle différents. La variabilité intra-essai est ≤ 10,98%.

10.1.2. Inter-essai

La variabilité entre dosages différents a été déterminée en répliquant (10x) la mesure de trois sérums de contrôle différents avec des coffrets appartenant à des lots différents. La variabilité inter-essai est ≤ 10,81%.

10.2. Sensibilité

La concentration minimale de FT4 mesurable est de 0,05 ng/dL avec une limite de confiance de 95%.

10.3. Spécificité

La réactivité croisée de l'anti- thyroxine avec certaines substances a été déterminée en ajoutant les solutions interférantes à une matrice de sérum à diverses concentrations. La réactivité croisée a été calculée en analysant le rapport entre la concentration de substances interférantes et la concentration de triiodothyronine nécessaire pour déplacer la même quantité de conjugué.

Substance	Reactivité croisée	Concentration
l -Thyroxine	1,0000	---
d -Thyroxine	0,9800	10 µg/dL
l-Triiodo-thyronine	0,0300	100 µg/dL
d-Triiodo-thyronine	0,0150	100 µg/dL
Monoiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Diiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Triiodothyroacetic Acid	N/D	100 µg/mL
Tetraiodothyroacetic Acid	0,0001	100 µg/mL

10.4. Corrélation contre référence RIA

Le coffret de FT4 (Diametra) a été comparé à un coffret disponible en commerce. 197 échantillons de sérum ont été testés. La courbe de régression est :
(FT4 RIA)=0,952*(FT4 Diametra) + 0,103
r^2 = 0,903

11. DISPOSITIONS RELATIVES À L'ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Les réactifs doivent être jetés conformément aux lois en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

- Barker, S.B, JBC 173, 175, (1948)
- Chopra, I.J, et al J. Clinical EndocrinoL, 33, 865 (1971)
- Young, D.S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
- Sterling, L, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975)

DiaMetra S.r.l. - Siège social : Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italie
Tél. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039–02–2133354.
Fabricant : Via Giustozzi 35/35a - Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italie
Tél. 0039-0742–24851
Fax 0039–0742–316197
Courriel : info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	**NOTICE D'INFORMATION**	

IT *Spiegazione dei simboli* **GB** *Explanation of symbols* **FR** *Explication des symboles* **ES** *Significado de los simbolos*

DE *Verwendete Symbole* **PT** *Explicaçao dos simbolos*

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Réferéncès du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
 	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d 'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l 'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

SUGGESTIONS POUR LA RÉSOLUTION DES PROBLÈMES / DÉPANNAGE

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant l'emploi
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs